

细胞质膜蛋白提取试剂盒

产品货号：26246

产品规格：50T/100T

产品简介：

细胞质膜蛋白提取试剂盒提供全套试剂，适用于从细胞和动物组织提取细胞质膜蛋白。提取过程简单方便。提取的膜蛋白不仅纯度高，保持天然活性，而且绝少交叉污染。

本试剂盒提取的蛋白可用于Western Blotting、蛋白质电泳、免疫沉淀、ELISA、转录活性分析、Gel shift凝胶阻滞实验、酶活性测定等下游蛋白研究实验。

本试剂盒提取的蛋白为具有天然蛋白构象的活性蛋白。

本试剂盒中不含有EDTA，与金属螯和层析等下游应用兼容。

本试剂盒提取的蛋白样本含有高浓度的盐成分，不可直接用于2D电泳，需要除盐后再用于2D电泳。

产品组成：

产品名称	50T	100T	保存
组分A：细胞质膜蛋白提取液A	25ml	50ml	2-8°C
组分B：细胞质膜蛋白提取液B	250μl	500μl	2-8°C
组分C：膜蛋白溶解液C	10ml	20ml	2-8°C
组分D：蛋白酶抑制剂混合物	100μl	200μl	-20°C

注：

1. 蛋白酶抑制剂未开盖使用前也可以2-8°C储存。开盖使用后-20°C储存。
2. 蛋白酶抑制剂在2-8°C低温时是固体状态，从冰箱取出后恢复至室温或37°C短时间水浴，变成液体状态后离心至管底部再开盖。
3. 试剂拆封后请尽快使用完！

自备试剂和仪器：

离心机、振荡器、匀浆器、涡旋混匀器、移液器、冰箱、冰盒，PBS缓冲液、蛋白定量试剂盒，离心管、吸头、一次性手套。

产品特点：

1. 使用方便，从细胞，组织中提取蛋白不需经过研磨、反复冻融、超声破碎等前处理。
2. 提取过程简单方便，将蛋白提取的时间缩短至1小时。
3. 含蛋白稳定剂，提取的蛋白稳定。
4. 紫外检测蛋白浓度时，背景干扰低。
5. 总蛋白提取液含多种有效成分，可以充分释放胞浆蛋白、核蛋白和膜蛋白，又可结合释出的蛋白防止沉淀。
6. 蛋白酶抑制剂抑制了蛋白的降解，蛋白酶抑制剂配方优化。蛋白酶抑制剂混合物包含6种独立的蛋白酶抑制剂AEBSF、Aprotinin、Leupeptin、Pepstatin A、Bestatin、E-64，每一种抑制剂可特异性抑制某一种或几种蛋白酶活性。该混合物优化的组成使其可以抑制几乎所有重要的蛋白酶活性，包括丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶、丙氨酰-氨基肽酶等。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

使用方法:

一、使用注意事项:

1. 旋帽离心管装的试剂在开盖前请短暂离心, 将盖内壁上的液体甩至管底, 避免开盖时液体洒落。
2. 实验过程中的所有试剂须预冷; 所有器具须放-20°C冰箱预冷。整个过程须保持样品处于低温。
3. 蛋白酶抑制剂储存期间溶液如果出现沉淀, 不影响使用, 溶解后正常使用。
4. 可以根据自己实验需要加入其它蛋白酶抑制剂单品。
5. Western实验内参可以选用Na-K ATPase。
6. 提取液A在使用前须一直置于2-8°C条件, 否则下游膜蛋白提取时会导致不容易分层。
7. 膜蛋白电泳时loading buffer应该避免煮沸。
8. 膜蛋白电泳时可以提高loading buffer的SDS含量。

二、操作步骤:

A. 细胞质膜蛋白提取

1. 试剂准备:

每500 μ l冷的蛋白提取液A中加入5 μ l试剂B和2 μ l蛋白酶抑制剂混合物, 混匀后置冰上备用。

【注】:

- 1) 根据需要处理的样品数量准备蛋白提取液, 蛋白酶抑制剂混合物不可以一次全部加入提取液。
 - 2) 加过蛋白酶抑制剂的提取液一周内未使用完, 再次使用前需要再次加入蛋白酶抑制剂。
 - 3) 以下步骤中使用的蛋白提取液为此步配制好的含蛋白酶抑制剂的提取液。
 - 4) 提取液A在使用前须一直置于2-8°C条件, 否则下游膜蛋白提取时会导致不容易分层。
2. 取5-10 \times 10⁶个以上细胞, 在4°C, 500 \times g条件下离心5分钟, 小心吸取培养基, 尽可能吸干, 收集细胞。

【注】

- 1) 贴壁细胞可以从培养器皿上消化下来或者用一次性细胞刮刀刮下来后处理, 也可以直接原位裂解处理。
 - 2) 原位处理时先小心吸取贴壁细胞的培养液, 用冷PBS洗涤细胞两次, 每次洗涤后尽可能吸干PBS。加入适量冷的蛋白提取液A, 4°C振荡20-30分钟, 至细胞充分裂解。
 - 3) 用细胞刮刀刮一遍, 将裂解液吸入另一干净离心管。
 - 4) 原位裂解时推荐提取液A使用量: 60mm培养皿250 μ l-500 μ l; 100mm培养皿500 μ l-1ml; 6孔板200-250 μ l/孔; 24孔板100 μ l/孔; 96孔板50 μ l/孔; 75cm²培养瓶500 μ l-1ml。
3. 用冷PBS洗涤细胞两次, 每次洗涤后尽可能吸干上清。

【注】:

- 1) 2000 \times g, 离心3-5分钟。
4. 细胞样品中加入300-500 μ l冷的试剂A, 高速涡旋充分混匀。

【注】:

- 1) 细胞数量根据实验情况调整, 每次的裂解液用量并不是一定的, 请根据实际情况调整。
 - 2) 由于膜蛋白含量较少, 需要较多的细胞才能保证得率。在条件允许的情况下, 尽可能加大细胞上样量。
5. 置2-8°C振荡30分钟。

【注】:

- 1) 此步骤必须在2-8°C处理, 不可在室温下操作。
 - 2) 裂解液用量并不是一定的, 请根据细胞数量实际情况调整。大约细胞样本和提取液体积比1:5-10, 根据实际情况调整提取液A用量。
 - 3) 由于质膜蛋白含量较少, 需要较多的细胞才能保证得率。
 - 4) 如果没有2-8°C持续振荡条件, 也可直接置2-8°C冰箱静置, 稍微延长处理时间, 中间每隔10分钟用移液器吹打混匀即可。
6. 高速涡旋振荡5秒, 然后在4°C, 12000 \times g条件下离心5分钟。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

7. 将上清吸入另一干净离心管，37°C水浴5-10分钟。

8. 在37°C下 500×g -1000×g力离心3分钟。

【注】：

1) 此步骤必须37°C条件下离心。

2) 如果离心机不可控温，可以不离心，延长上一步骤水浴时间，至溶液分层清晰即可。或者在室温条件下离心，缩短离心时间至1分钟。

9. 此时溶液分为两层，下层是膜蛋白约为30-50μl。

【注】：

1) 下层为粘稠状液体。

10. 小心移除上层，用50-150μl冷的试剂C溶解下层质膜蛋白部分，充分混匀，即得细胞质膜蛋白。

【注】：

1) 膜蛋白比较难溶解，不能很快溶解混匀，可以在加入溶解液后稍微吹打混匀，然后置于4°C冰箱静置至溶解。中途用移液器轻轻吹打混匀一次。静置后取出再次用移液器稍微吹打混匀即可。

2) 静置直至管底透明胶状物完全溶解。

11. 将上述蛋白提取物定量后分装于-80°C冰箱保存备用或直接用于下游实验。

【注】：

1) 建议用BCA法进行蛋白定量。

2) 蛋白样品-80°C存放一年没有问题。注意不要被蛋白酶水解掉，不要被细菌污染。

B. 组织样本质膜蛋白提取

1. 取适量组织样本用手术剪刀尽可能剪碎，加入冷的蛋白提取液A，用组织匀浆机/匀浆器匀浆至无明显肉眼可见固体，将匀浆吸入另一预冷的干净离心管。

【注】：

1) 每个样大约50-100mg组织。样品较大可以相应增加提取液用量。

2. 按照细胞蛋白的提取方法的第5步骤往下操作即可。

常见问题分析：

1. 蛋白浓度低？

膜蛋白丰度较低，必须保证足够的细胞样品上样量才能收获足够的蛋白，在条件允许的情况下，请尽可能增加细胞量。处理部分细胞或组织样本时可能没有裂解完全，导致蛋白浓度低。只要适当延长试剂A的处理时间即可。最好在持续振荡的条件下处理，没有振荡器也可间隔几分钟用吸头吹打混匀。

2. 用什么方法定量蛋白？

建议用BCA法。不适合用Bradford法，因为试剂A中含有干扰Bradford法的组份，导致定量不准。如果已经进行过透析处理或者用脱盐柱改换过缓冲体系，则可以用Bradford法定量。

3. 提取的蛋白具有活性吗？

本试剂盒不含有离子型去垢剂组份，不破坏蛋白的结构，没有对蛋白质之间原有的相互作用的破坏，蛋白均保持其天然构象和活性。

4. 膜蛋白电泳没有条带？

膜蛋白样品通常浓度较低，电泳前一定要进行蛋白定量，以保证电泳是蛋白上样量足够。

膜蛋白提取好后，用溶解液充分溶解后，可以超声处理一下，再进行蛋白定量。

蛋白加Loading buffer后可以不用煮沸，采用50°C保温30分钟。

蛋白Loading buffer中SDS终浓度含量可以提高至3%-10%。

有些样品的膜蛋白含量太低，可以使用丙酮沉淀膜蛋白，再使膜蛋白溶解于上样缓冲液中，一般可以跑出清晰的蛋白条带。

电泳时最后采用低电压低电流电泳。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

注意事项:

1. 正式实验前请选取几个样本做预实验，以优化实验条件，取得最佳实验效果。
2. 螺旋盖微量试剂管装的试剂在开盖前请短暂离心，将盖和管内壁上的液体离心至管底，避免开盖时试剂损失。
3. 禁止与其他品牌的试剂混用，否则会影响使用效果。
4. 样品或试剂被细菌或真菌污染或试剂交叉污染可能会导致错误的结果。
5. 最好使用一次性吸头、管、瓶或玻璃器皿，可重复使用的玻璃器皿必须在使用前清洗并彻底清除残留清洁剂。
6. 实验后完成后所有样品及接触过的器皿应按照规定程序处理。
7. 本试剂盒仅供科学研究使用，不可用于诊断或治疗。
8. 避免皮肤或粘膜与试剂接触；如果试剂不小心接触皮肤或眼睛，应立即用水冲洗。

保存: 2-8°C保存，有效期1年。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com